



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació

SEMINARIS DE RECERCA

6 de novembre de 2018

DIAGNÒSTIC DE LA INFECCIÓ PER *TRYPANOSOMA CRUZI*: NOUS ASPECTES, REPTES I PERSPECTIVES

Alba Abras, Cristina Ballart, Carmen Muñoz, Montserrat Gállego

Secció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, UB
Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB

INTRODUCCIÓ

Concepte i generalitats

Morfologia, formes evolutives i diversitat genètica

Cicle biològic i vies de transmissió

Epidemiologia

Patologia i clínica

Diagnòstic

Context actual

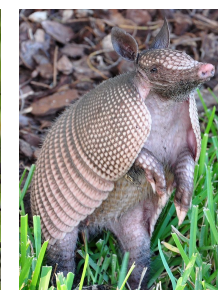
Concepte i generalitats



Insectes reduïds hematòfags (CDC-DPDx).



Zona rural (Miles, 2017. Infectious diseases. 4a edició. Elsevier. p. 1065-1072)

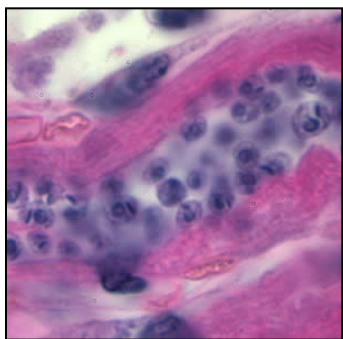


Exemples de reservoris de *T. cruzi* (W. Commons).

Morfologia, formes evolutives i diversitat genètica



Tripomastigot

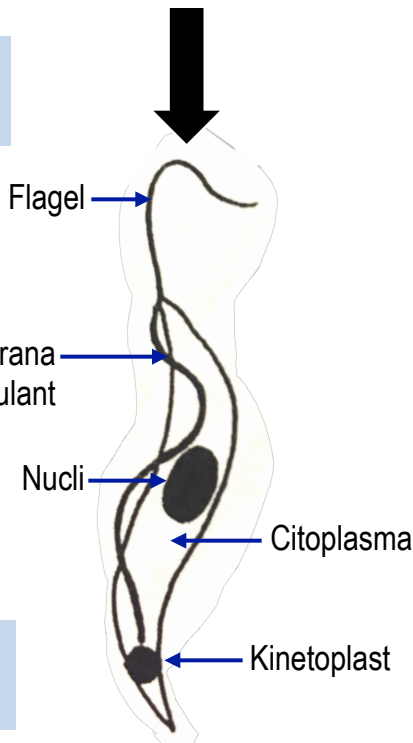


Amastigot

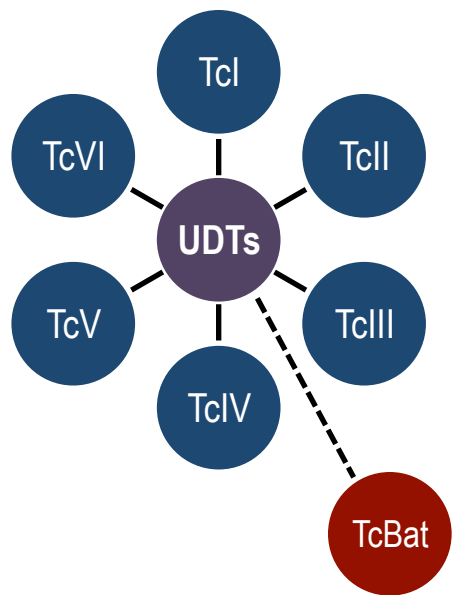
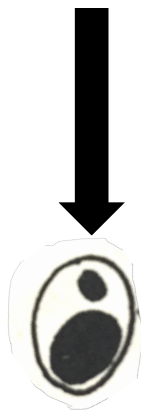


Epimastigot

Extrem anterior



Extrem posterior



Tipologies morfològiques de *T. cruzi* amb las principals estructures. Imatges: CDC-DPDx. Esquemes: Gállego Berenguer, 2007 (Morfología y Biología de los parásitos de interés sanitario).

Cicle biològic i vies de transmissió

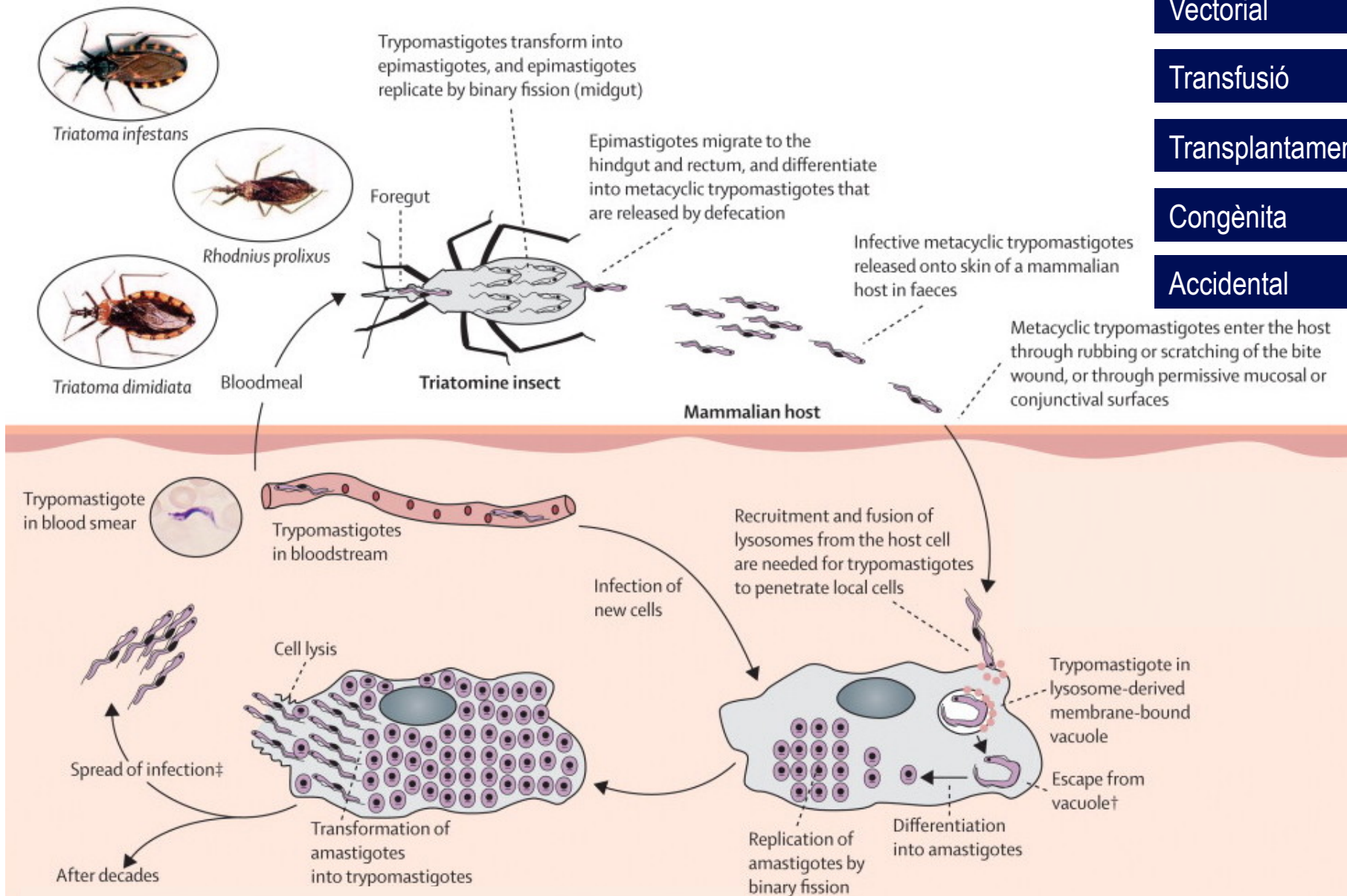
Vectorial

Transfusió

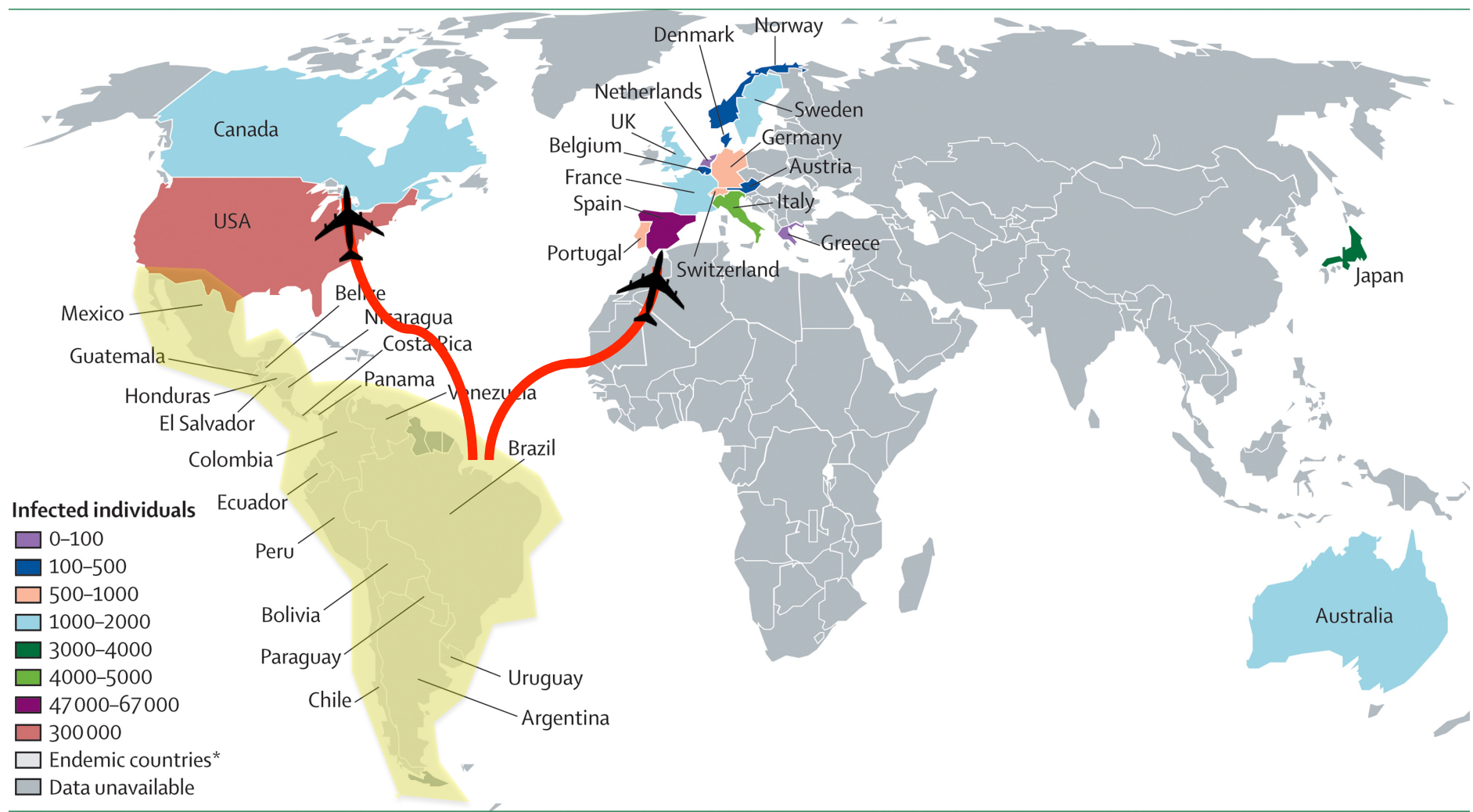
Transplantament

Congènita

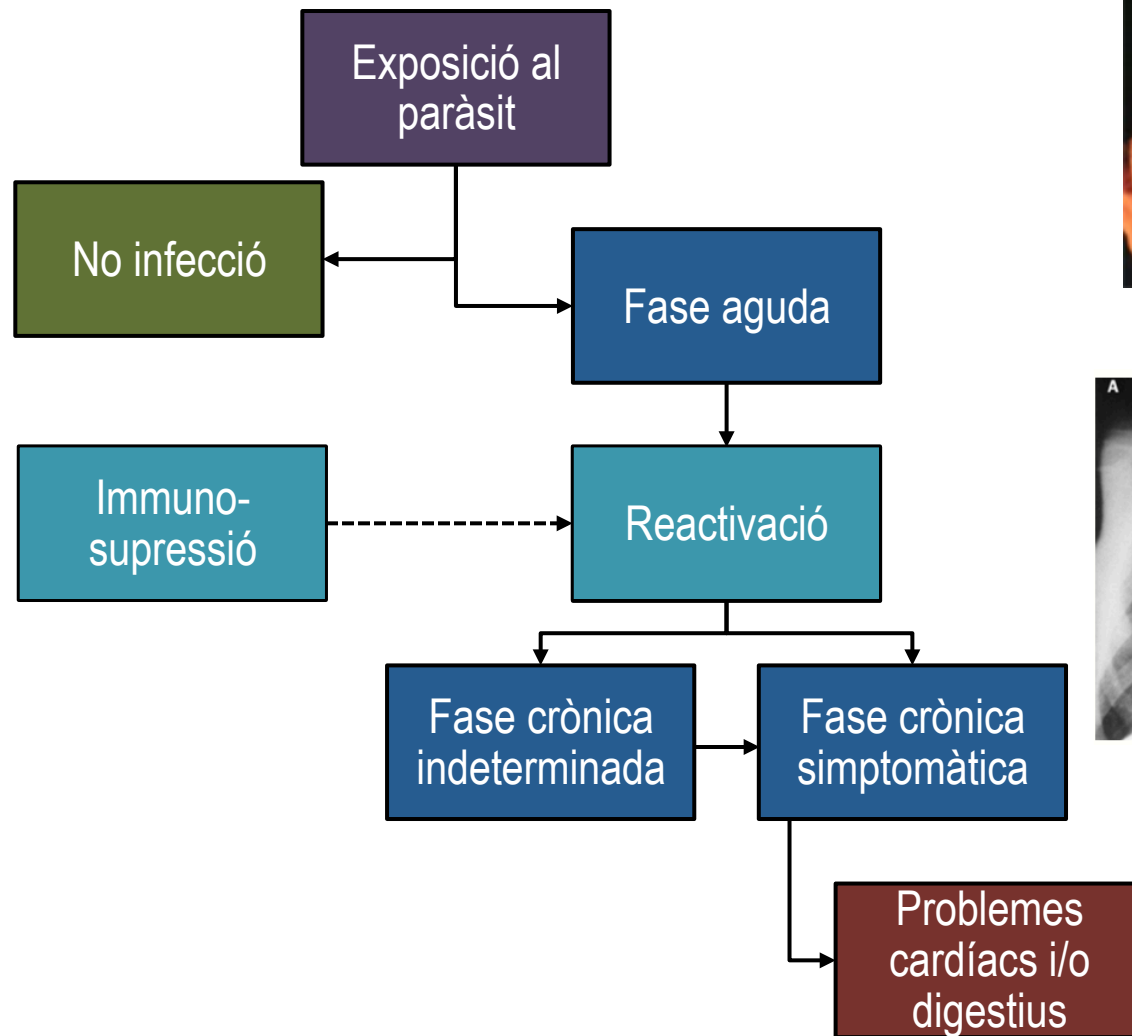
Accidental



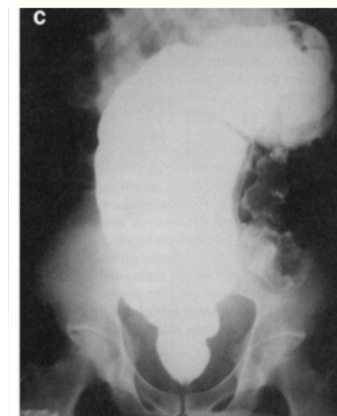
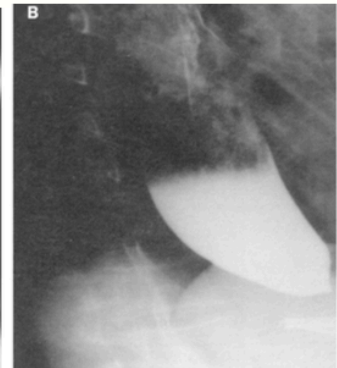
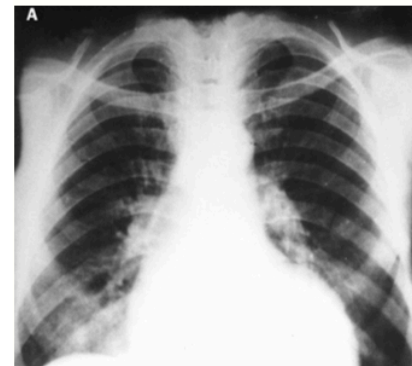
Epidemiologia



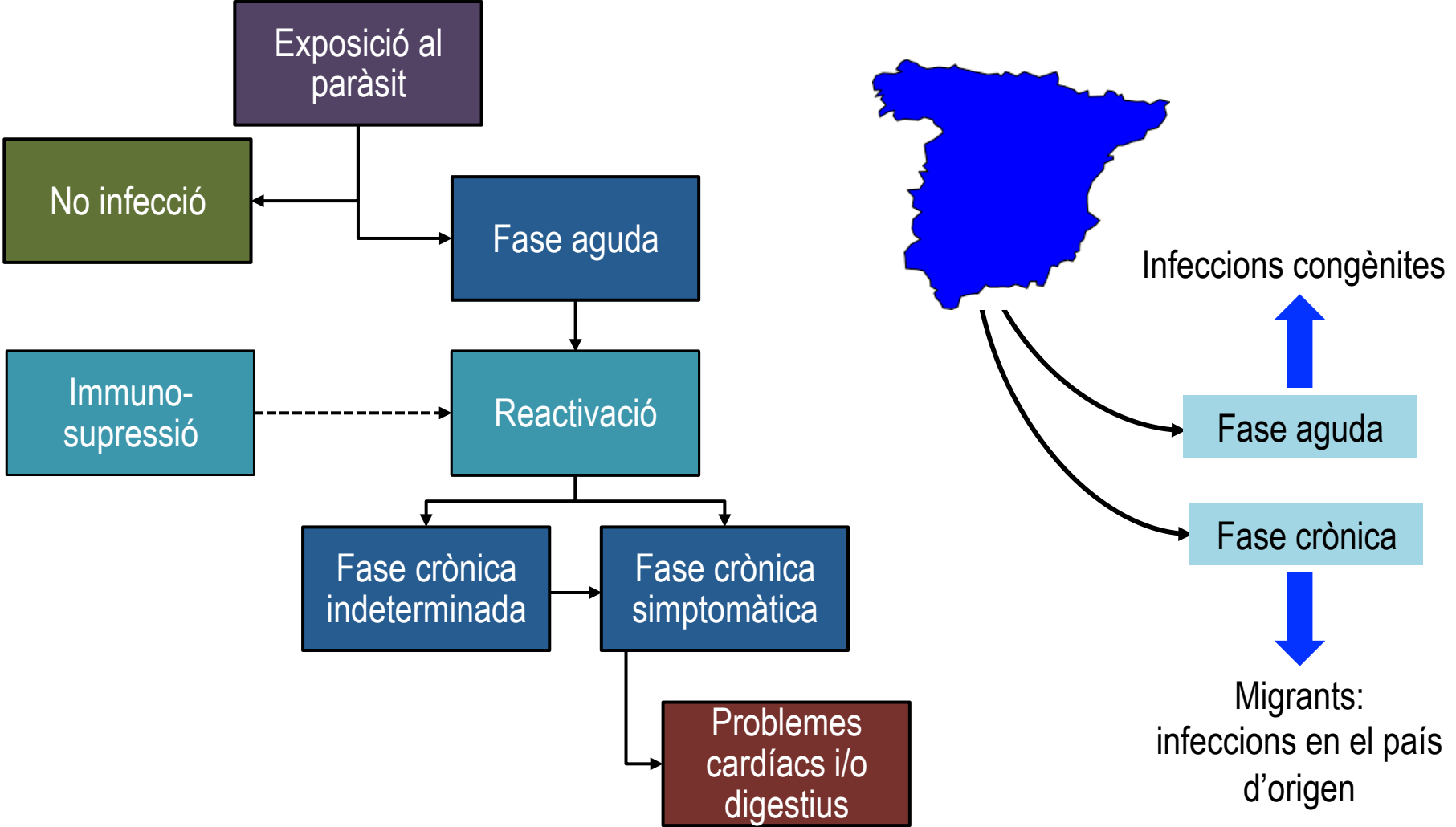
Immigrants amb infecció por *T. cruzi* residents en països no endèmics (Rassi et al., 2010. Lancet 375:1388-1402).



Signe de Romaña (CDC)



Megàlies de cor, esòfag i colon (Barret et al., 2003. Lancet 362:1469-1480)



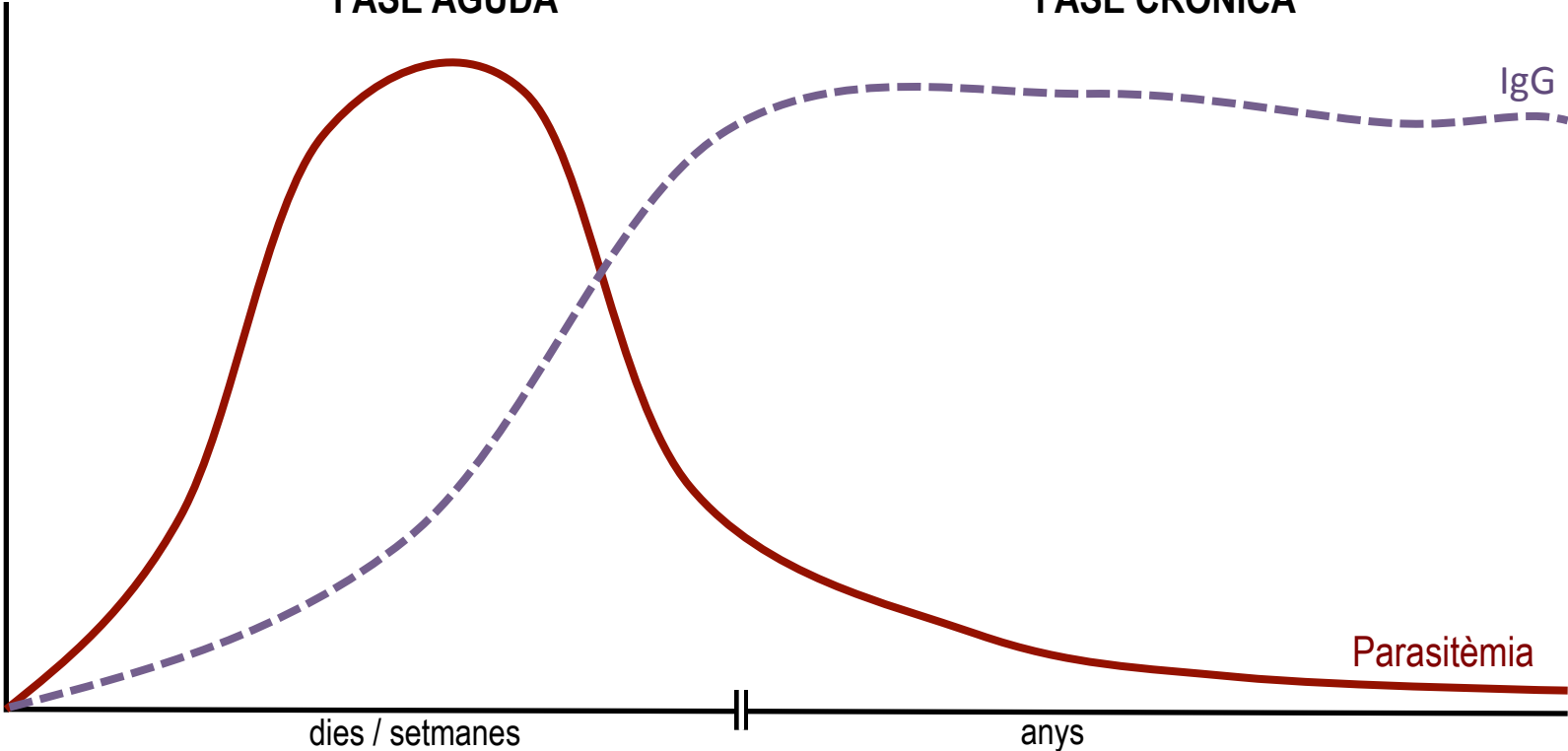
DIAGNÒSTIC DIRECTE
MÈTODES PARASITOLÒGICS
I MOLECULARS

DIAGNÒSTIC INDIRECTE
MÈTODES IMMUNOLÒGICS

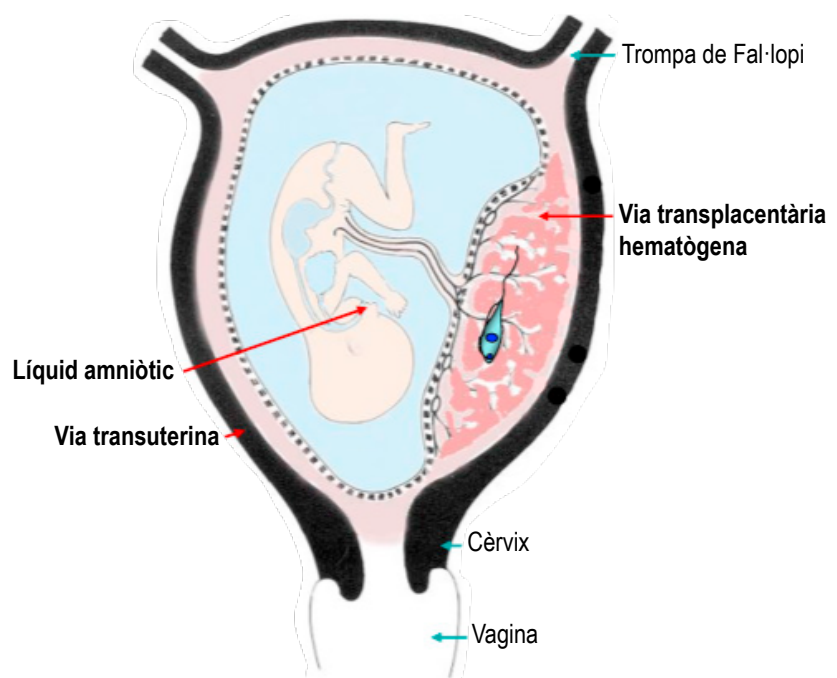
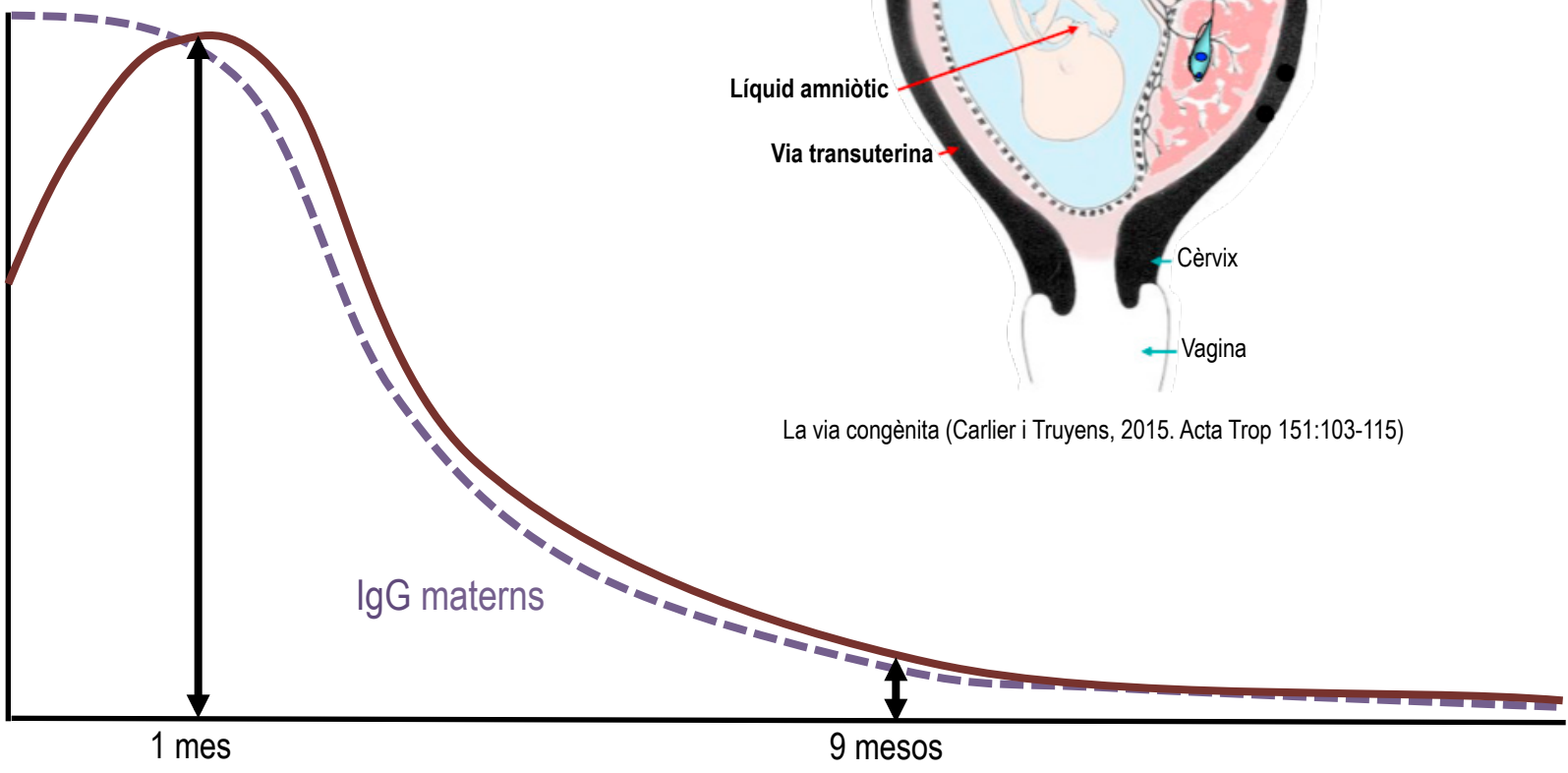


FASE AGUDA

FASE CRÒNICA



INFECCIÓ CONGÈNITA



La via congènita (Carlier i Truyens, 2015. Acta Trop 151:103-115)

Diagnòstic parasitològic

- L'observació del paràsit confirma la infecció.
- Requereix personal especialitzat.
- La sensibilitat depèn de l'experiència de l'observador.
- Cultiu requereix període més llarg de temps per obtenir els resultats.
- Dificultat de diagnòstic en la fase crònica.

Diagnòstic serològic

- No existeix estàndard de referència.
- Necessitat de realitzar més d'una tècnica.
- Persistència post-tractament en pacients crònics.
- Transmissió d'anticossos materns al nadó.
- Reaccions creuades.
- Nova generació de tests disponibles.

Diagnòstic molecular

- PCR i Real-Time PCR.
- Diagnòstic precoç en congènits per elevada sensibilitat.
- Transferència DNA matern al nadó.
- Disminució de la sensibilitat en pacients crònics.
- Falta de consens entre laboratoris.
- Tests comercials i automatitzats disponibles.

Tipificació molecular

- Possible associació entre UDT i desenvolupament clínic de la malaltia.
- Gran varietat de marcadors moleculars però sense consens.
- Cal tenir en compte la diversitat genètica de *T. cruzi* alhora de desenvolupar tests diagnòstics.

OBJECTIUS

Degut a la gran diversitat de mètodes disponibles pel diagnòstic de la malaltia de Chagas i a la falta de consens en la seva implementació, el nostre grup es va plantejar aprofundir en la problemàtica d'aquest diagnòstic i en la caracterització molecular de *Trypanosoma cruzi*.

Els objectius van ser:

- 1. Assajar i comparar diferents tècniques per diagnosticar la malaltia de Chagas, a nivell serològic i molecular, en les diferents etapes de la malaltia.**
- 2. Establir algorismes diagnòstics cost-efectius d'acord amb aquestes etapes.**
- 3. Avaluar diferents mètodes de caracterització dels genotips de *T. cruzi* en adults i nadons.**

DIAGNÒSTIC SEROLÒGIC

Estudi preliminar

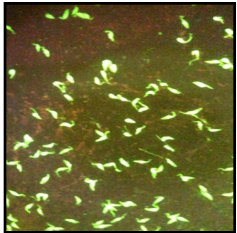
Architect Chagas i infecció crònica

Architect Chagas i infecció congènita

Estudi preliminar

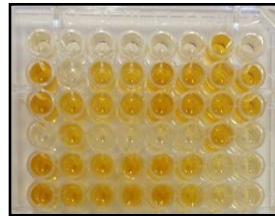
Tècniques convencionals

IFI



- ***T. cruzi* IFI kit (Trinity Biotech)**
- Ag sencer (epimastigots)
- Dilucions dobles progressives
- Positiu $\geq 1:40$ i negatiu $< 1:40$

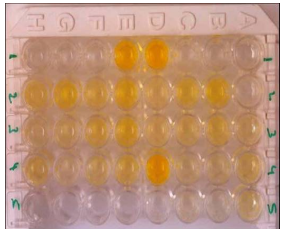
ELISAc



- ***In house* (Riera et al., 2009)**
- Ag total
- Epimastigots sonicats
- Positiu $\geq 20U$ i negatiu $< 20U$

Tècniques recombinants

ELISAr



- **BioELISA Chagas (Biokit)**
- Proteïna TcF (4 pèptids actius)
- Positiu ≥ 1 , negatiu $< 0,9$ i ZG $\geq 0,9 < 1$

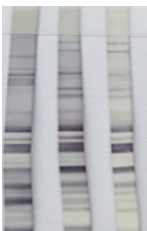
CMIA



- **ARCHITECT Chagas (Abbott)**
- 4 proteïnes (FP3, FP6, FP10 i TcF)
- 14 regions antigèniques
- Positiu ≥ 1 , negatiu $< 0,8$ i ZG $\geq 0,8 < 1$

Tècnica de desempat

WB



- ***In house* (Riera et al., 2012)**
- Ag total
- Epimastigots lisats
- Positiu $\geq 5/6$ bandes: 28, 32, 38, 39, 40 i 48 KDa

Estudi preliminar

247 sèrums



15 dubtosos

	IFI	ELISAc	ELISAr	CMIA
IFI		1	4	0
ELISAc	6		2	1
ELISAr	2	0		6
CMIA	2	3	1	

*1 sèrum negatiu per IFI i ELISAr, positiu per ELISAc i zona gris per CMIA

*1 sèrum positiu per IFI i ELISAr, negatiu per ELISAc i zona gris per CMIA



Positiu



Negatiu

IFI ≥ 1:40	ELISAc ≥ 20U	ELISAr ≥ 1	CMIA ≥ 1	WB ≥ 5 b	EDAT
POS 1:40*	POS 53*	NEG 0,06	NEG 0,31	NEG	ADULT
POS 1:160	POS 31	NEG 0,58	NEG 0,08	NEG	ADULT
POS 1:40	POS 29	NEG 0,11	NEG 0,08	NEG	ADULT
POS 1:40	POS 21	NEG 0,57	NEG 0,04	NEG	ADULT
POS 1:40	POS 28	NEG 0,64	NEG 0,08	NEG	ADULT
POS 1:40	POS 30	NEG 0,09	NEG 0,32	NEG	NADÓ
POS 1:40	NEG 11	POS 1,74	NEG 0,24	NEG	ADULT
POS 1:80	NEG 13	POS 1,5	GZ 0,87	NEG	NADÓ
POS 1:40	NEG 16	NEG 0,38	POS 5,23	NEG	NADÓ
POS 1:160	NEG 17	NEG 0,17	POS 3	NEG	NADÓ
NEG 1:20	POS 21	NEG 0,61	POS 3,96	NEG	NADÓ
NEG 1:20	POS 26	NEG 0,76	POS 4,17	NEG	NADÓ
NEG 1:20	POS 27	NEG 0,88	POS 4,45	NEG	NADÓ
NEG 1:20	POS 32	NEG 0,87	GZ 0,87	NEG	ADULT
NEG 1:20	NEG 17	POS 1,26	POS 1,44	NEG	NADÓ

Estudi preliminar

247 sèrums



15 dubtosos

232



6 FP per CMIA



Sens. (%)

IFI

ELISAc

ELISAr

CMIA

Esp. (%)

Efic. (%)

99,32

100

99,32

100

91,25

95

98,75

98,75

96,46

98,23

99,12

99,56

IFI

ELISAc

ELISAr

CMIA

VP

145

146

145

146

FP

7

4

1

7

VN

79

82

85

79

FN

1

0

1

0

232

232

232

232

VP

145

146

145

146

FP

7

4

1

1

VN

73

76

79

79

FN

1

0

1

0

226

226

226

226

Architect Chagas i infecció crònica

Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, Ballart C Martí C, Muñoz C. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change? J Clin Microbiol 2016, 54(6):1566-1572.

N = 315

PANELL I (n = 107)

- Adults amb Chagas crònic
- Zona endèmica
- Resultats coincidents ELISAc i ELISAr

PANELL II (n = 125)

- Adults no-chagàsics
- 64 zona endèmica
- 61 zona no endèmica
- Resultats coincidents ELISAc i ELISAr

PANELL III (n = 12)

- Adults amb resultats discordants ELISAc i ELISAr
- Zona endèmica
- WB per interpretació final
- 11 negatius i 1 positiu

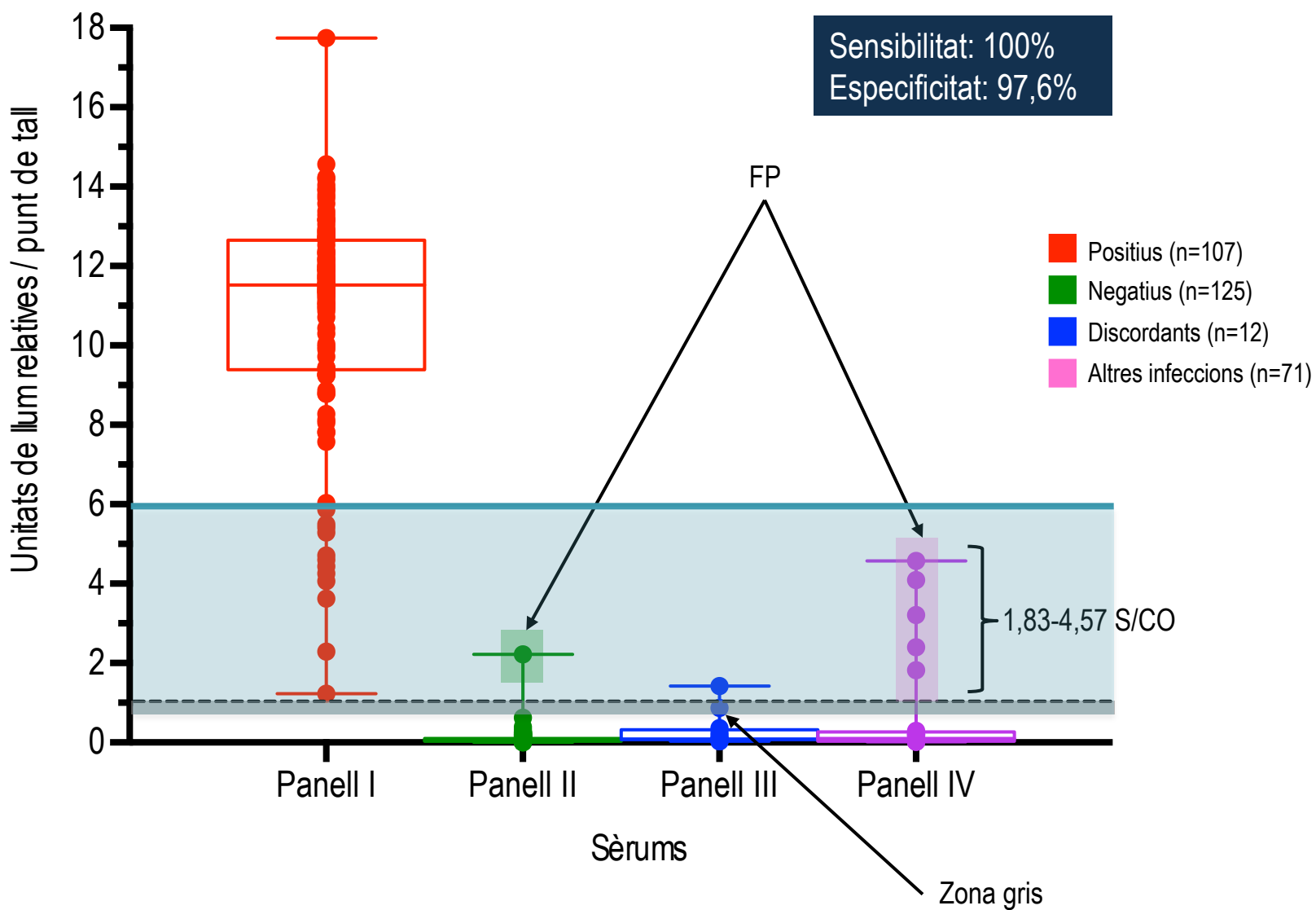
PANELL IV (n = 71)

- Adults amb altres infeccions
- Zona no endèmica
- Avaluació de reaccions creuades
- Leishmaniosi, entre d'altres

CMIA Architect Chagas

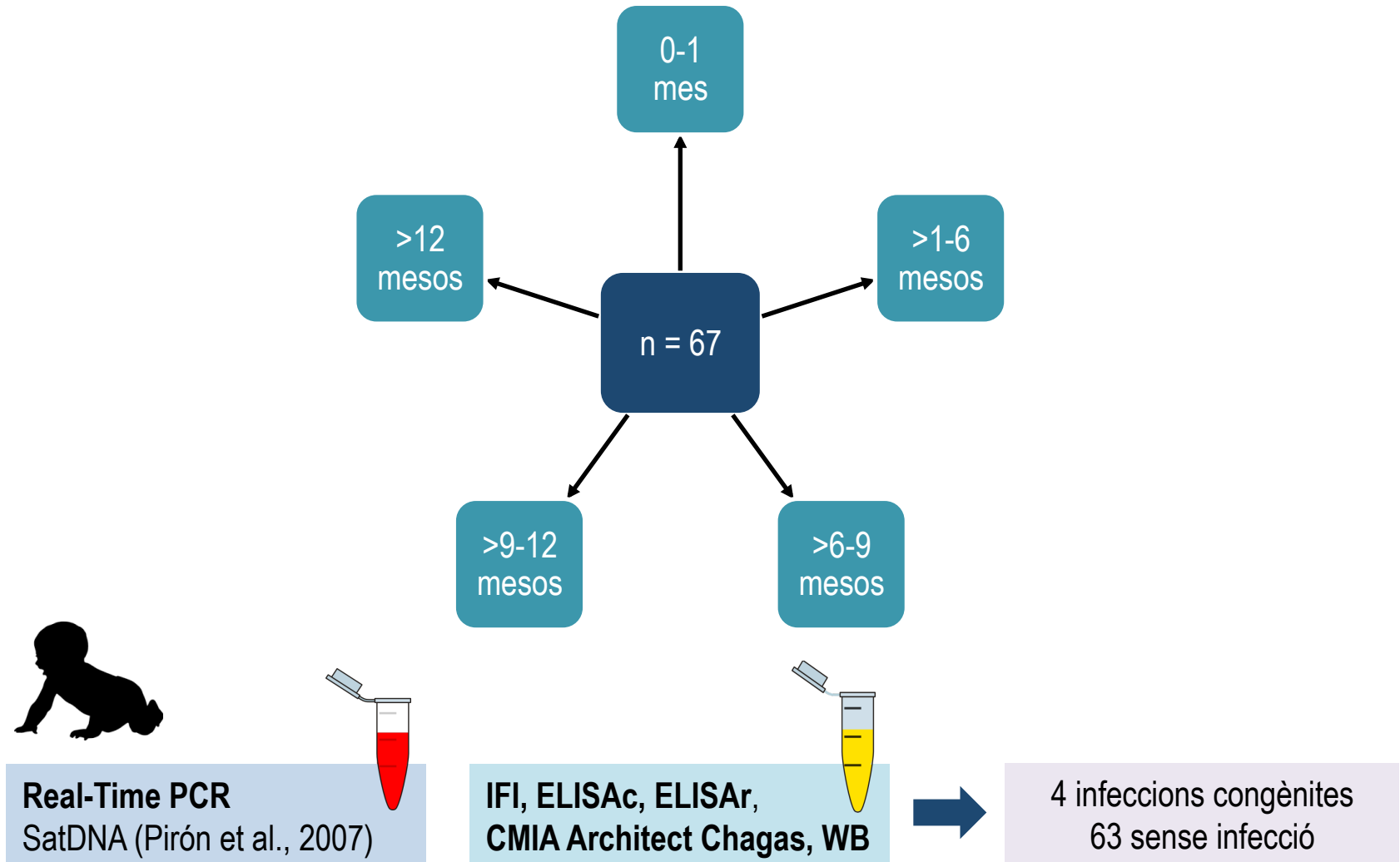


Architect Chagas i infecció crònica



Architect Chagas i infecció congènita

Abras A, Muñoz C, Ballart C, Berenguer P, Llovet T, Herrero M, Tebar S, Pinazo MJ, Posada E, Martí C, Fumadó V, Bosch J, Coll O, Juncosa T, Ginovart G, Armengol J, Gascón J, Portús M, Gállego M. Towards a new strategy for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. J Clin Microbiol 2017, 55(5):1396-1407.



Architect Chagas i infecció congènita

Casos congènits

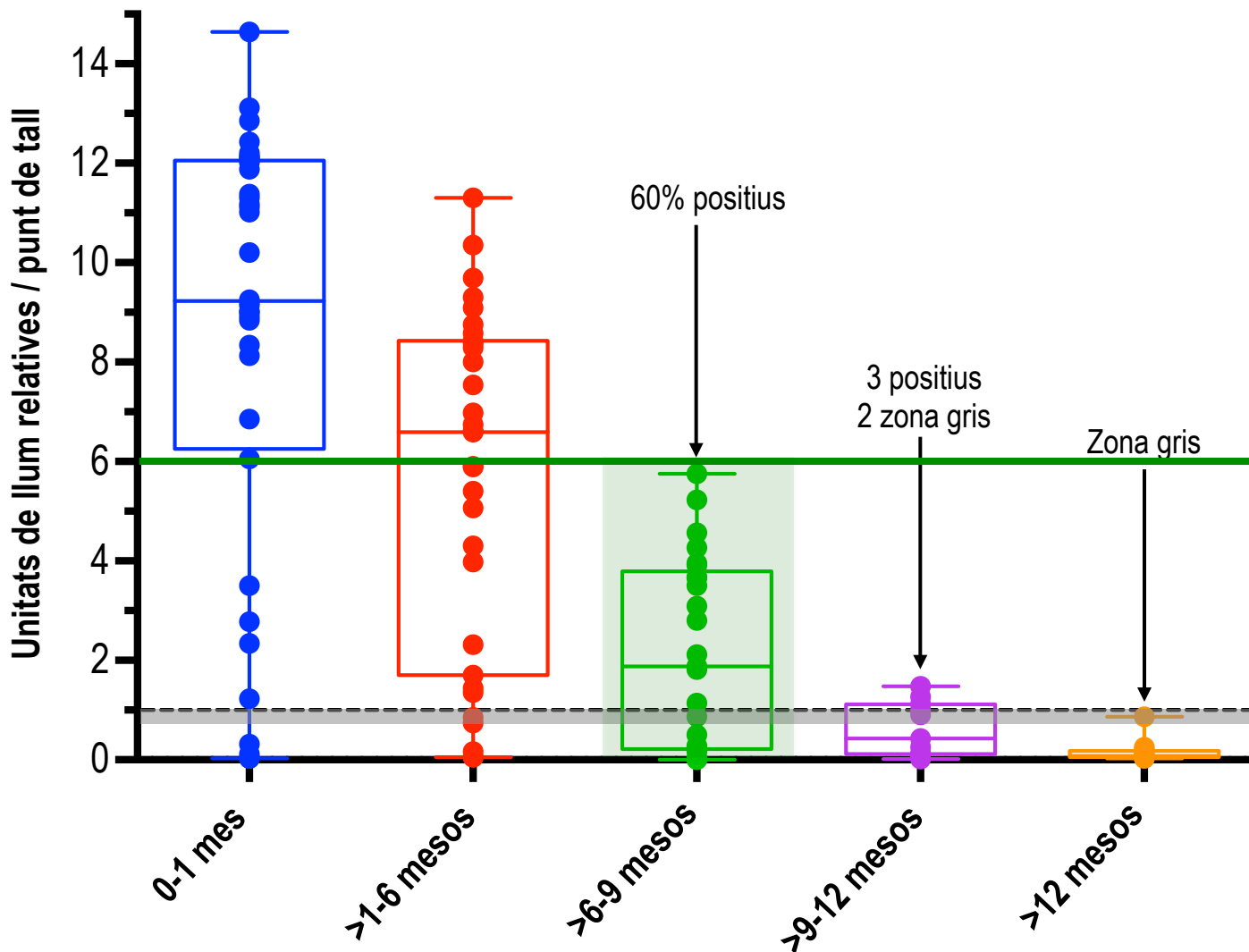
N = 4

		PCR	IFI	ELISAc	ELISAr	CMIA	WB
Cas 1	Mare	-	≥1:5120	169	8.39	12.31	6/6
	0-1m	-	1:2560	-	8.52	-	-
	>1-6m	-	1:640	76	6.82	7.97	5/6
	>6-9m	-	1:640	-	7.47	-	-
	>9-12m	Pos	1:640	-	6.67	-	-
	1m Pt.	-	1:640	-	8.70	-	-
	12m Pt.	-	1:80	42	1.63	3.57	0/6
Cas 2	Mare	Pos	1:1280	200	7.60	11.07	5/6
	>12m	Pos	1:1280	162	5.99	12.04	5/6
	Durant Tr.	Neg	-	164	5.96	11.78	3/6
	5m Pt.	Neg	-	116	5.11	10.29	3/6
	16m Pt.	Neg	1:160	89	3.87	8.25	1/6
	3a Pt.	Neg	-	66	2.07	8.07	1/6
	4a Pt.	Neg	1:80	54	1.35	7.66	0/6
Cas 3	Mare	Pos	1:2560	178	5.78	10.9	5/6
	0-1m	Pos	1:1280	279	5.56	11.22	5/6
	1d Pt.	-	1:320	95	3.52	5.02	3/6
	2a Pt.	Neg	-	8	0.2	-	-
Cas 4	Mare	Pos	1:1280	159	2.65	12.81	5/6
	0-1m	Neg	1:1280	141	3.1	-	-
	>12m	Pos	1:1280	143	6.41	11.64	5/6
	7m Pt.	Neg	1:320	105	5.77	7.21	5/6

Architect Chagas i infecció congènita

Nens no infectats

N = 63



PROTOCOLS I COST-EFECTIVITAT

Proposta pel Chagas crònic

Proposta pel Chagas congènit

Proposta pel Chagas crònic

Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, Ballart C Martí C, Muñoz C. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change? J Clin Microbiol 2016, 54(6):1566-1572.



CMIA Architect Chagas
Determinació única



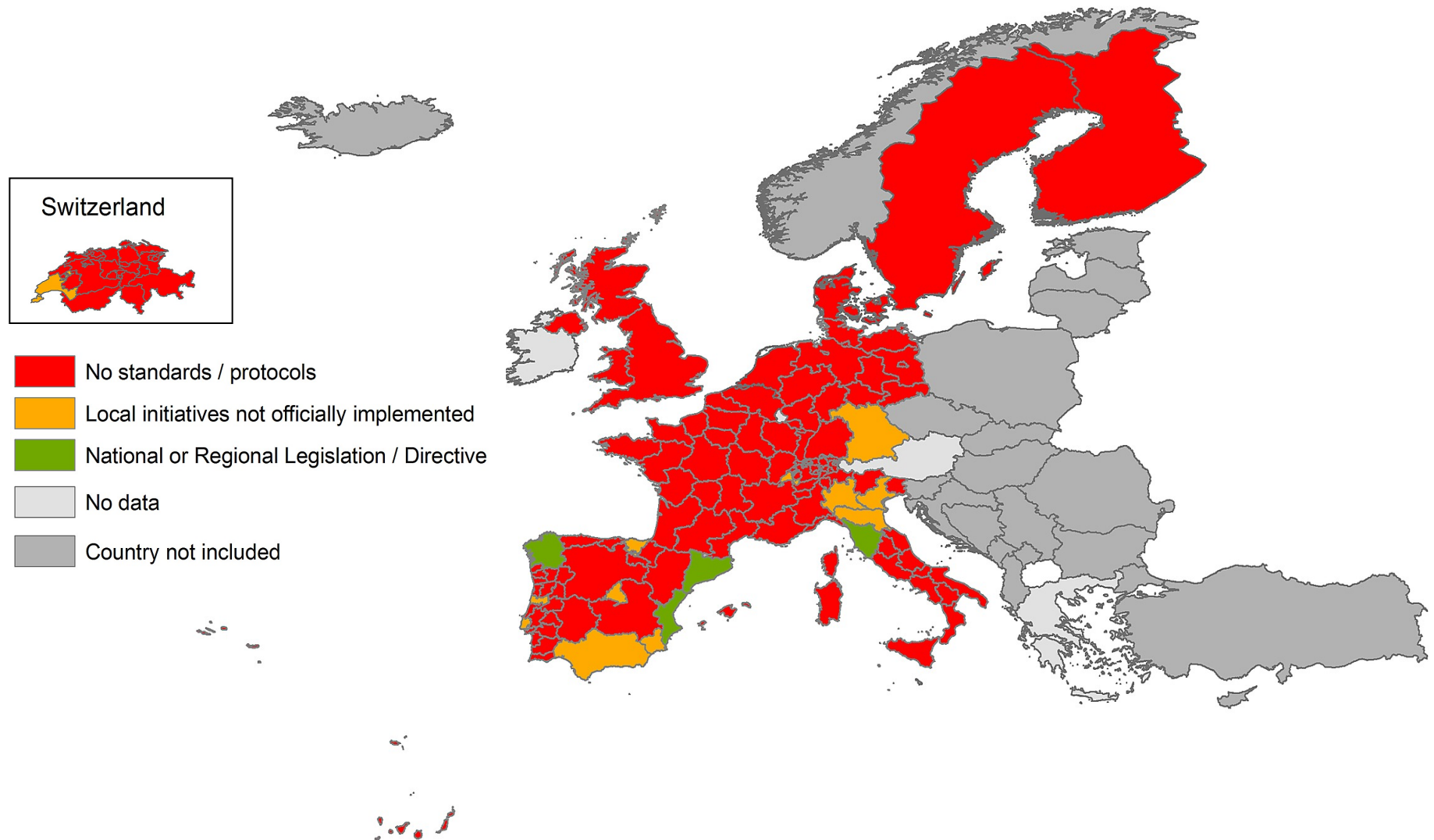
Confirmació zona gris i
positius ≤ 6 S/CO
6,3% mostres analitzades



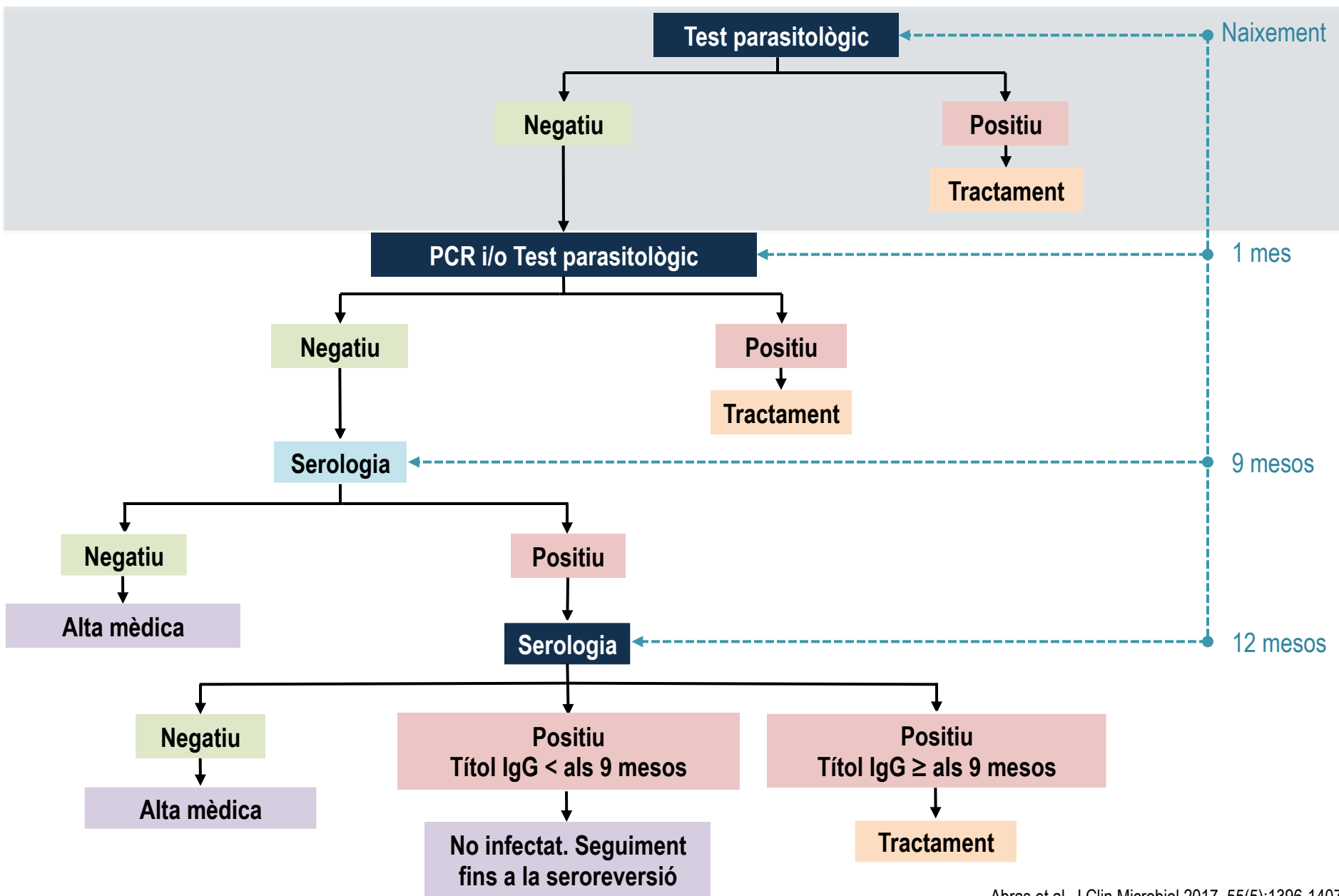
Estalvi superior a 4.000 € / any

Objectius	Mètodes serològics i moleculars				
	Convencionals			No convencionals	
	ELISA	IFI	HAI	Ag recombinants	PCR
Evidència serològica (dos tests recomanats)	X	X	X	X	
Cribatge bancs sang (un test recomanat)	X				
Infecció congènita (dos tests recomanats)	X	X		X	X
Enquestes epidemiologia (un test recomanat)	X	X			
Seguiment de tractament (dos tests recomanats)	X	X	X		X

Proposta pel Chagas congènit



Proposta pel Chagas congènit

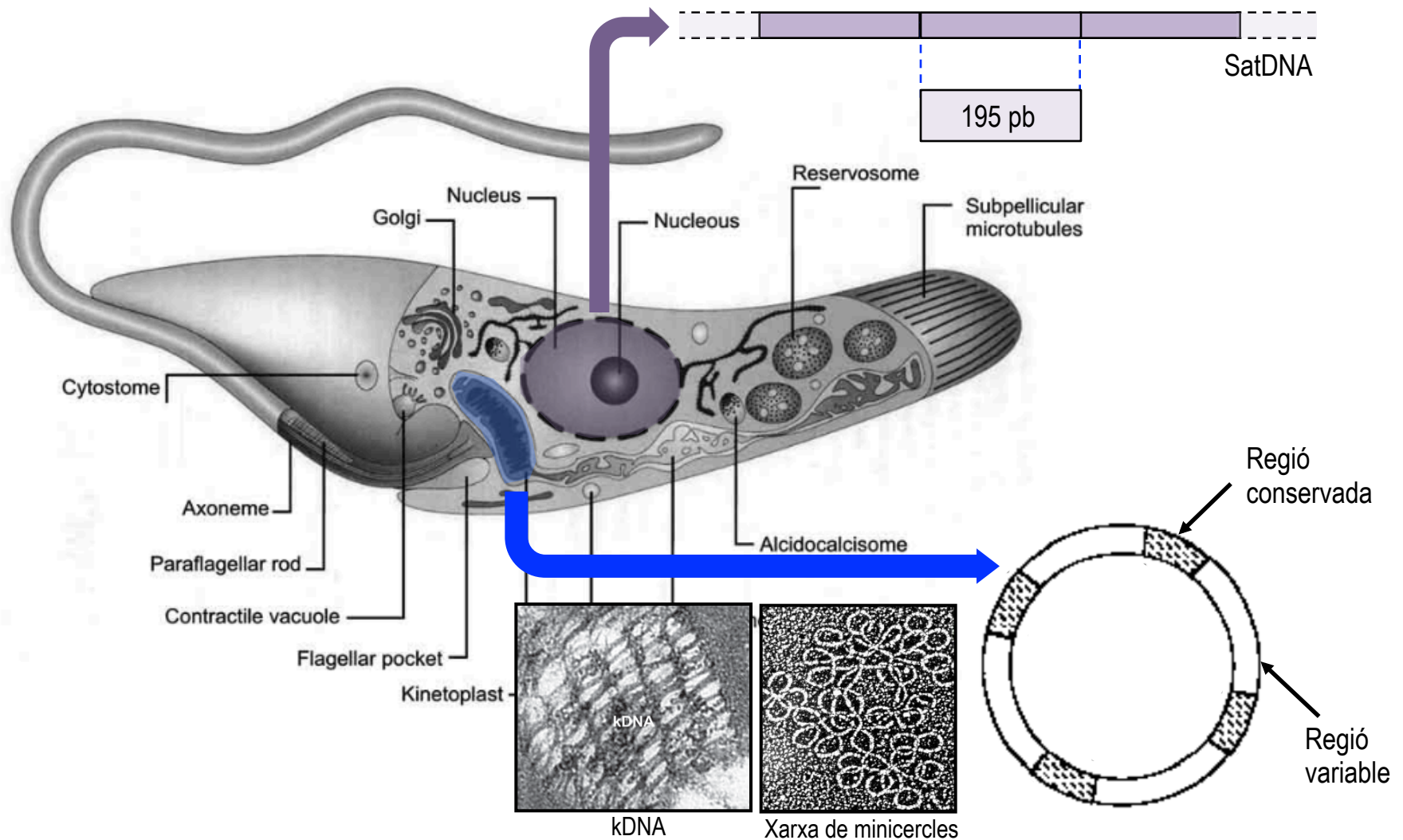


DIAGNÒSTIC MOLECULAR

Dianes més utilitzades

Avaluació d'un sistema automàtic i comercial

Dianes més utilitzades

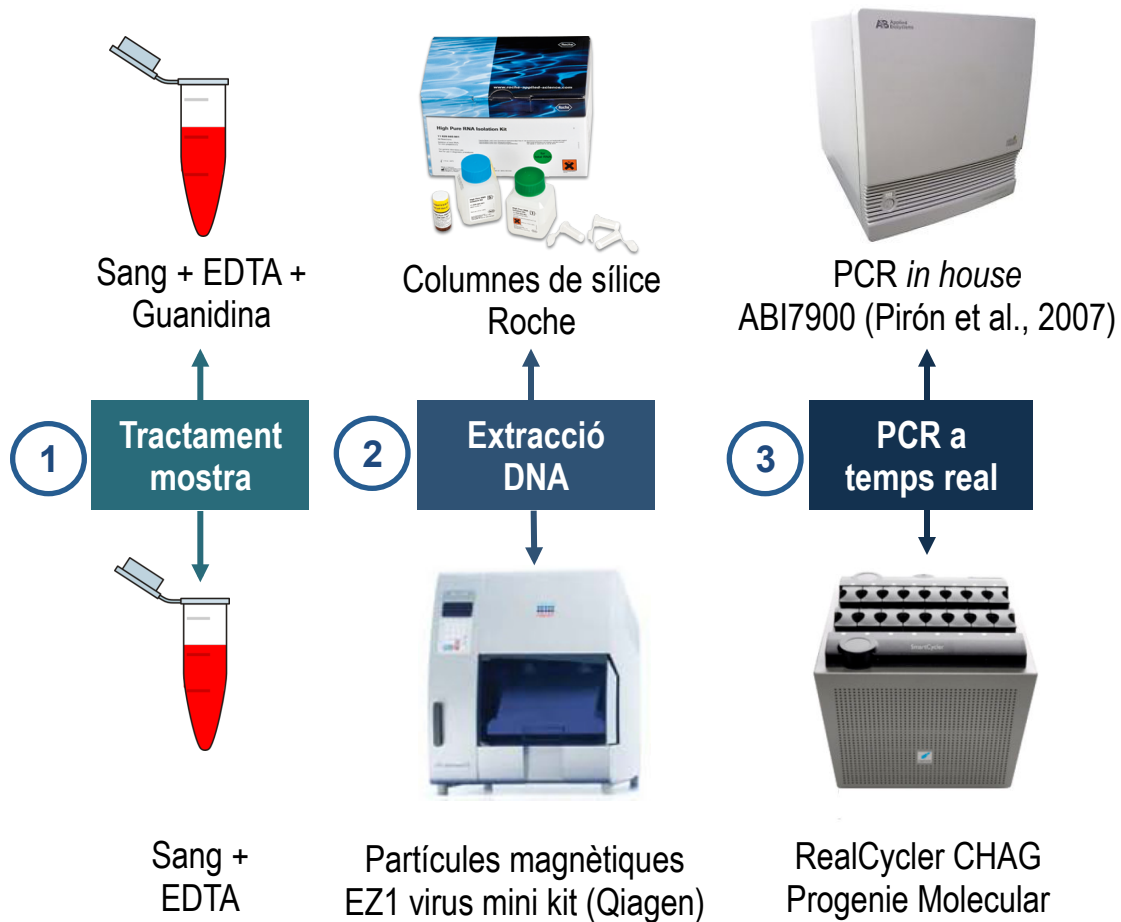


Estructura interna d'un epimastigot de *T. cruzi* (de Souza, 2008. Mem Inst Oswaldo Cruz 103:313-325). ADN satèl·lit modificat de Schijman, 2015 (A: Viotti y Vigliano. Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica). ADNk extret de Teixeira et al., 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz 101:463-491. Xarxa de minicercles de kDNA(B) extret de Schijman, 2015.

Avaluació d'un sistema automàtic i comercial

Abras A, Ballart C, Llovet T, Roig C, Gutiérrez C, Tebar S, Berenguer P, Pinazo MJ, Posada E, Gascón J, Schijman AG, Gállego M, Muñoz C. Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: a comparative study of sample treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. PLoS One 2018, 13(4):e0195738.

Protocol de referència Facultat de Farmàcia UB (A)



n = 123

Panell I (n = 36): no infectats. 19 nadons de mares chagàsiques, 5 adults de zona endèmica i 12 adults de zona no endèmica.

Panell II (n = 65): pacients amb Chagas crònic no tractats.

Panell III (n = 22): mostres infectades experimentalment amb cultiu d'epimastigots de *T. cruzi* i mostres no infectades com a controls.

Protocol de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (H)

Avaluació d'un sistema automàtic i comercial

Protocol	N	Tractament mostra	Extracció d'ADN	Real-Time PCR	Mostres positives	Mostres inhibides
A	123	GEB	Columnes sílice Roche	<i>In house</i>	72	0
B	123	GEB	Columnes sílice Roche	RealCycler	59	0
C	62	GEB	Partícules magnètiques Qiagen	<i>In house</i>	8	35
D	62	GEB	Partícules magnètiques Qiagen	RealCycler	25	17
E	25	EB	Columnes sílice Roche	<i>In house</i>	11	0
F	25	EB	Columnes sílice Roche	RealCycler	11	0
G	64	EB	Partícules magnètiques Qiagen	<i>In house</i>	15	2
H	64	EB	Partícules magnètiques Qiagen	RealCycler	15	0

Avaluació d'un sistema automàtic i comercial

	Protocols	N	K	Positius	Inhibicions	N excloent inhibicions	Discordant excloent inhibicions	K excloent inhibicions
Comparació amb el protocol de referència (A)	A-B	123	0,79	59	0	123	13	0,79
	A-C	62	0,17	8	35	27	8	0,45
	A-D	62	0,29	24	17	45	10	0,53
	A-E	25	0,92	11	0	25	1	0,92
	A-F	25	0,76	10	0	25	3	0,76
	A-G	64	0,92	15	2	62	0	1
	A-H	64	1	15	0	64	0	1



- Quan s'apliquen variacions en el protocols originals (A i H), els resultats són menys convincents.
- La posada a punt de tot el procediment és clau per obtenir resultats satisfactoris.

Avaluació d'un sistema automàtic i comercial

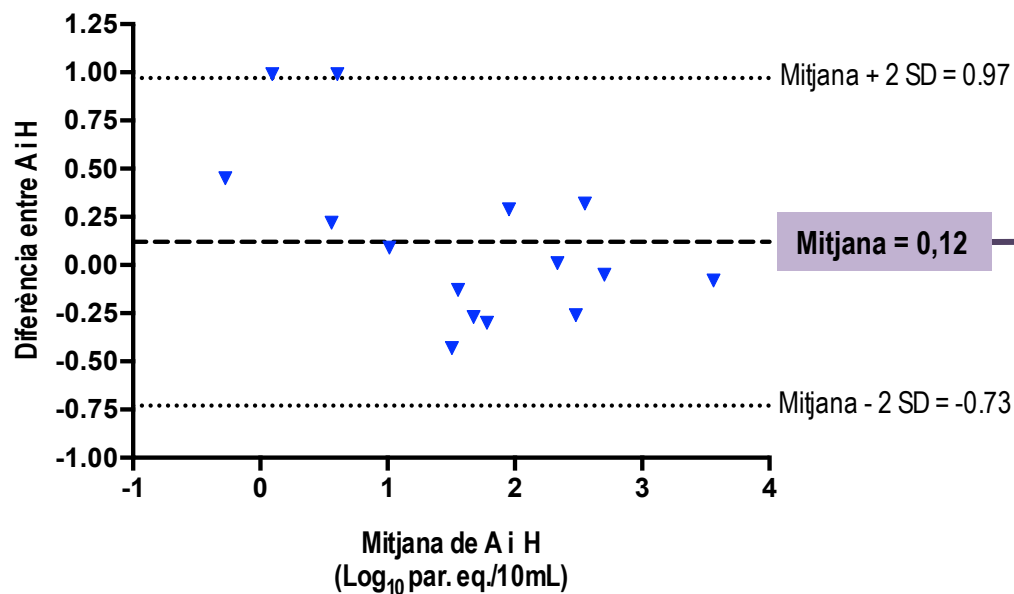
Protocols	N	K	Positius	Inhibicions	N excloent inhibicions	Discordant excloent inhibicions	K excloent inhibicions
-----------	---	---	----------	-------------	------------------------	---------------------------------	------------------------

Comparació amb el protocol de referència (A)

$$r_s = 0,97$$

Associació elevada i positiva entre protocols

A-H	64	1	15	0	64	0	1
-----	----	---	----	---	----	---	---



Protocols equivalents i intercanviables

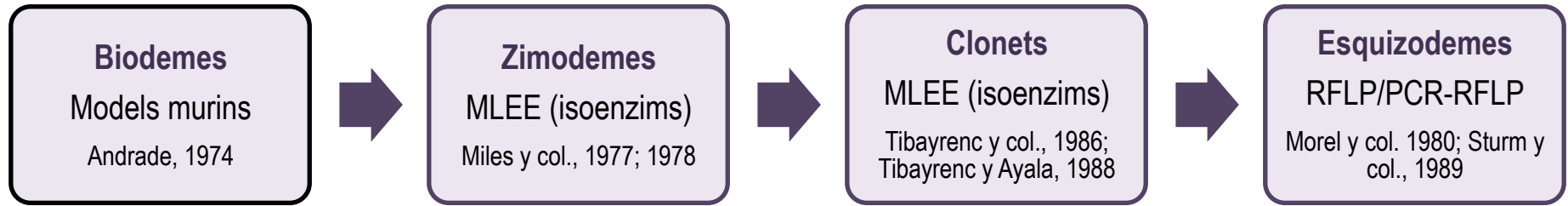
H: Aplicable al diagnòstic de rutina

TIPIFICACIÓ MOLECULAR

Diversitat genètica i taxonomia

Avaluació de mètodes de caracterització

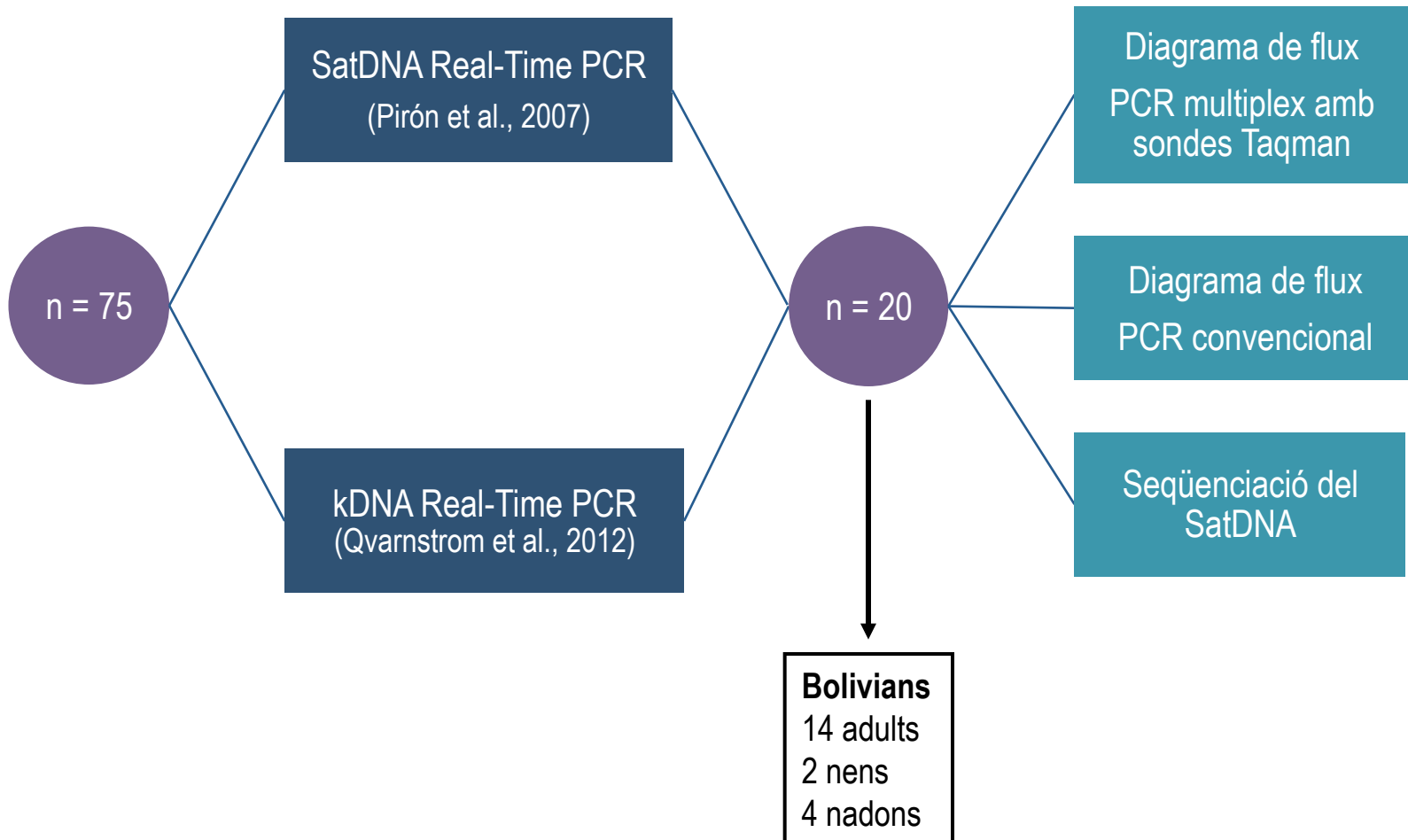
Diversitat genètica i taxonomia



Satellite meeting, 1999	Brisse et al., 2000; 2001	Zingales et al., 2009
<i>T. cruzi</i> I	TcI	TcI
<i>T. cruzi</i> II	TcIIa	TcIV
	TcIIb	TcII
	TcIIc	TcIII
	TcIIId	TcV
	TcIIe	TcVI

Avaluació de mètodes de caracterització

Abras A, Gállego M, Muñoz C, Juiz NA, Ramírez JC, Cura CI, Tebar S, Fernández-Arévalo A, Pinazo MJ, de la Torre L, Posada E, Navarro F, Espinal P, Ballart C, Portús M, Gascón J, Schijman AG. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). Parasitol Int 2017, 66(2):83-88.

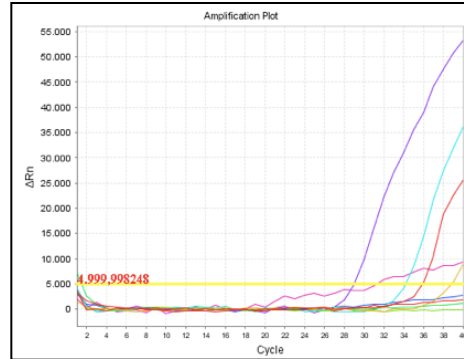


Avaluació de mètodes de caracterització

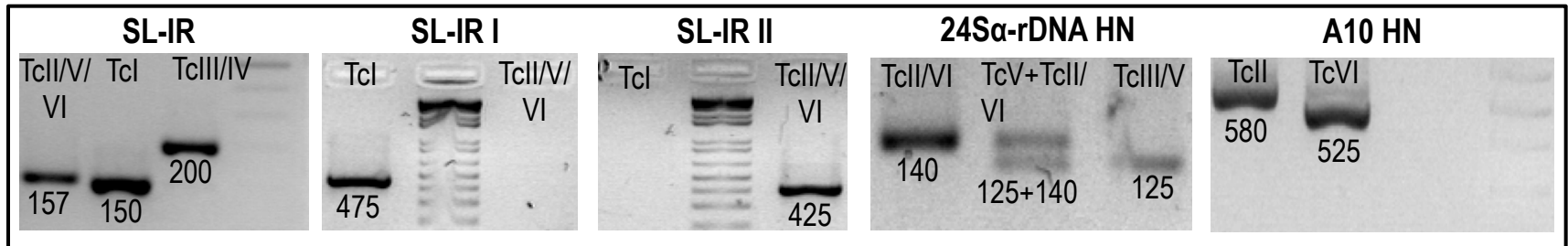
1 PCR multiplex amb sondes Taqman (MTq-PCR)



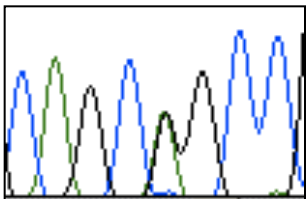
SL-IR
18S-COII
24Sα



2 PCR convencional

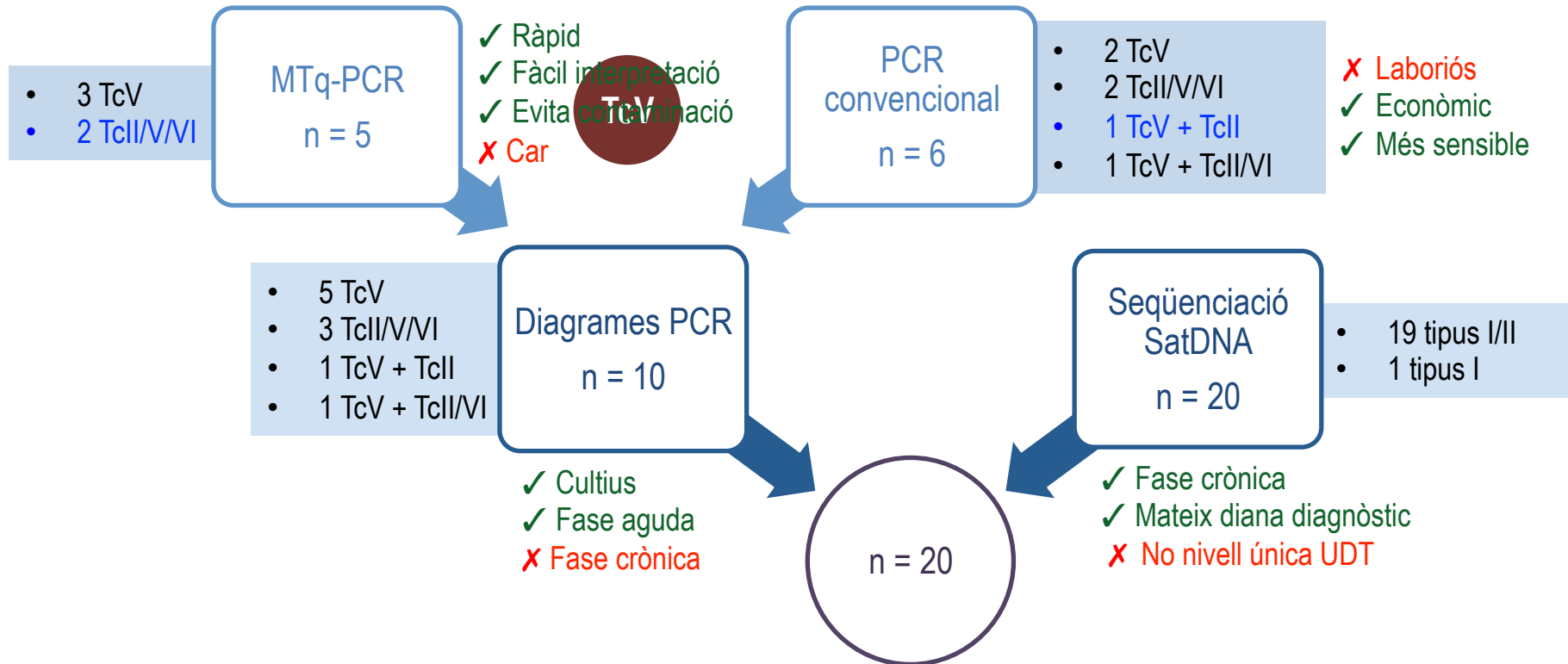


3 Seqüenciació del SatDNA



Seqüència SatDNA	UDTs
Tipus I	TCI-III
Tipus II	TCII-IV
Tipus I-II	TCV-VI

Avaluació de mètodes de caracterització

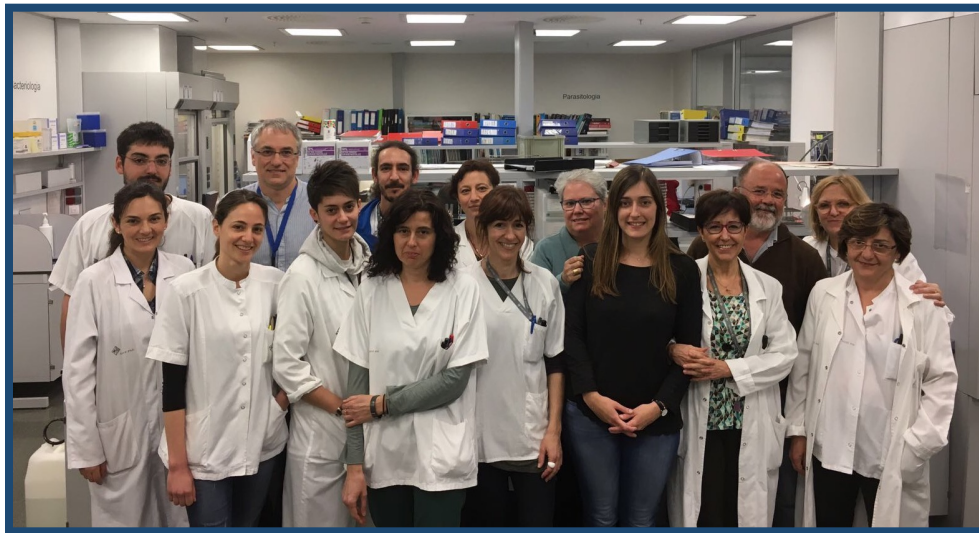


Població segons edat	N	Càrrega parasitària segons SatDNA qPCR (par. eq./mL)	Caracteritzats diagrames PCR	Caracteritzats seqüenciació
Nadons congènits (21 dies a 10 mesos)	4	937,7-20,2	4	4
Casos pediàtrics (10 i 13 anys)	2	1,5-NQ	1	2
Adults crònics (26 a 43 anys)	14	10,5-NQ	5	14

CONCLUSIONS

- I. Architect Chagas és un sistema altament efectiu pel diagnòstic de la malaltia de Chagas crònica, amb el 100% de sensibilitat i permetent el diagnòstic de la majoria de mostres quan s'utilitza com a única tècnica. Per contra, per la seva elevada sensibilitat no és el mètode més adequat pel diagnòstic de la infecció congènita quan es realitza una única serologia als nou mesos d'edat.
- II. Architect Chagas es pot utilitzar com a única tècnica diagnòstica per la infecció crònica. Només les mostres en zona gris i les positives amb resultat ≤ 6 S/CO caldrà que siguin confirmades per un segon test serològic per evitar falsos positius i reaccions creuades amb *Leishmania* spp. L'aplicació d'aquesta proposta resultaria en un estalvi molt important en el cost del diagnòstic de la malaltia de Chagas i, per tant, també en el control i la gestió de la infecció.
- III. En el cas del diagnòstic de la infecció congènita, proposem una nova estratègia més cost-efectiva i amb un nombre reduït de proves a realitzar en comparació amb els protocols europeus existents. El protocol podria començar al mes d'edat amb un test parasitològic i/o una PCR. Si és negatiu, es realitzaria una serologia als nou mesos, seguida d'una altra serologia confirmatòria als 12 mesos en cas d'un resultat positiu. La proposta permetria un estalvi significatiu en el cost del diagnòstic de la infecció congènita per *T. cruzi*.

- IV. Pel diagnòstic molecular, el protocol totalment automatitzat i comercial (sang amb EDTA, EZ1 Virus Mini Kit v2.0 i RealCycler CHAG) es troba en perfecte concordança amb el protocol de referència (sang amb EDTA + Guanidina, Columnes de sílice de Roche i PCR *in house*) el que el fa una bona opció pel diagnòstic de rutina de la infecció per *T. cruzi*. El mètode permet obtenir resultats en aproximadament dues hores, de manera senzilla i amb el mínim de manipulació humana. Quan es realitzen variacions en els protocols originals els resultats que s'obtenen són menys convincents indicant que cal una posada a punt de tot el procediment per tal d'obtenir resultats satisfactoris. L'estudi contribueix a l'estandardització de protocols entre laboratoris i a l'aplicació de la PCR en els centres de salut.
- V. Finalment, en el cas de la caracterització molecular de *T. cruzi*, els diagrames de flux basats en PCR són molt útils per determinar les UDTs en les poblacions naturals del paràsit però no són prou sensibles per a l'anàlisi de pacients amb càrregues parasitàries baixes. L'anàlisi de les seqüències de SatDNA no permeten discriminar entre les poblacions de *T. cruzi* a nivell d'una única UDT però fan possible incrementar el nombre de casos caracteritzats en pacients amb infecció crònica. La UDT més identificada va ser TcV, comú a Bolívia i predominant en sang perifèrica.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



HOSPITAL DE LA
SANTA CREU I
SANT PAU

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

ISGlobal **Barcelona**
Institute for
Global Health

INGEBI-CONICET



Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética
y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres"





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Farmàcia
i Ciències de l'Alimentació

SEMINARIS DE RECERCA

6 de novembre de 2018

DIAGNÒSTIC DE LA INFECCIÓ PER *TRYPANOSOMA CRUZI*: NOUS ASPECTES, REPTES I PERSPECTIVES

Alba Abras, Cristina Ballart, Carmen Muñoz, Montserrat Gállego

Secció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, UB
Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, UAB